

**PAT-NO:** JP360188096A  
**DOCUMENT-  
IDENTIFIER:** JP 60188096 A  
**TITLE:** METHOD FOR MEASURING TOTAL AMOUNT OF POLYAMINE  
**PUBN-DATE:** September 25, 1985

**INVENTOR-INFORMATION:**

<b>NAME</b>	<b>COUNTRY</b>
ISOBE, KIMIYASU	
MATSUNAGA, KUNIYOSHI	
YAMADA, HIDEAKI	
OTSUJI, SEIGO	

**ASSIGNEE-INFORMATION:**

<b>NAME</b>	<b>COUNTRY</b>
AMANO PHARMACEUT CO LTD	N/A

**APPL-NO:** JP59045279

**APPL-DATE:** March 8, 1984

**INT-CL (IPC):** C12Q001/26 , G01N033/50

**US-CL-CURRENT:** 435/25

**ABSTRACT:**

**PURPOSE:** To measure the total amount of polyamines in a sample reading and simply with a high accuracy, by pretreating the sample containing various polyamines with a polyamine oxidase, and reacting the pretreated sample with an amine oxidase.

**CONSTITUTION:** Spermine in a sample containing various polyamines is first converted into spermidine and/or putrescine with a polyamine oxidase, and hydrogen peroxide formed in the process is completely removed by the conventional method. An amine oxidase capable of acting on the spermidine, putrescine and cadaverine to produce equimolar amount of hydrogen oxide without producing the putrescine from the spermidine is reacted with the above-mentioned sample to color and determine colorimetrically the produced hydrogen peroxide.

**COPYRIGHT:** (C)1985,JPO&Japio

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭60-188096

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

C 12 Q 1/26  
G 01 N 33/50

識別記号

庁内整理番号  
8213-4B  
E-8305-2G

⑭ 公開 昭和60年(1985)9月25日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑮ 発明の名称 総ポリアミン量の測定法

⑯ 特願 昭59-45279

⑰ 出願 昭59(1984)3月8日

⑱ 発明者 磯部 公安 江南市藤ヶ丘5-1-4 江南団地84-409  
⑲ 発明者 松永 國義 一宮市丹陽町五日市場71番地の2  
⑳ 発明者 山田 秀明 京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1  
㉑ 発明者 尾辻 省悟 鹿児島市小松原1-37-10  
㉒ 出願人 天野製薬株式会社 名古屋市中区錦1丁目2番7号

明細書

1. 発明の名称

総ポリアミン量の測定法

2. 特許請求の範囲

各種ポリアミン含有試料をポリアミン酸化酵素で処理し、試料中のスペルミンをスペルミジンおよび/又はブトレツシンに変換せしめるとともにその際生成する過酸化水素を消去した後、更にスペルミジン、ブトレツシン及びカダベリンに作用する酸化酵素を添加し、反応させ、生成する過酸化水素を定量することによって試料中のポリアミン量を求める特徴とする総ポリアミン量の測定法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、酵素法による試料中の総ポリアミン量の迅速、簡便かつ精度のよい測定法に関するものである。

ポリアミンは、生物界に広く分布する非蛋白性低分子量の脂肪族塩基性化合物で、細胞の分裂、増殖及びその生化学的背景をなす核酸の代謝に重

要な役割を果たしている物質として知られている。

哺乳動物の生体中では、スペルミン、スペルミジン、ブトレツシン、カダベリンが主として存在しており、これらをまとめ総ポリアミンと称している。

近年、癌患者の尿中、血中、リンパ液中などのいわゆる体液中の総ポリアミン量が正常人に比して著しく増加することならびに治療によって総ポリアミン量が減少することが報告されている。

従って、臨床検査において癌の診断、癌の治療効果の判定及び予後の診断等において総ポリアミン量の測定が有効な手段となりつつある。

従来、総ポリアミン量の定量法としては、ガスクロマトグラフィーによる方法 (クリニカル・ケミストリー (Clin.Chem.) 第19巻、第 904~907頁 (1973))、アミノ酸分析計による方法 (フェブス・レターズ (FEBS Lett.) 第46巻、第 305~307頁 (1974))、高速液体クロマトグラフィーによる方法 (ジャーナル・オブ・クロマトグラフイー (J.Chromatography) 第 145巻、第 141~146

頁(1978)などの化学的方法が主として用いられてきた。しかしながらこれら化学的方法は、迅速性に欠ける上に、処理操作が極めて煩雑で多くの検体を処理できず、又特殊な機器、設備等を必要とするため、一般臨床検査への応用は困難であった。一方、最近酵素を用いる総ポリアミン量の測定法も提案された(特公昭56-36918号、特開昭59-2700号、特開昭58-141798号及び特開昭58-146297号)。このうち特公昭56-36918号方法は、遊離型ポリアミン含有試料に発芽大豆由来のアミンオキシダーゼを作用させ、生成する過酸化水素を発色させ、比色定量する方法であり、特開昭59-2700号方法は、遊離型及び結合型ポリアミン含有試料にあらかじめアスコルビン酸オキシダーゼを作用させて反応阻害物質の影響を除去したのち、発芽大豆由来のアミンオキシダーゼを作用させ、生成する過酸化水素を発色させ、比色定量する方法である。

しかしながら、これら酵素法による総ポリアミン量測定法はいずれも次のような欠点を有している

ことが判明した。

これら酵素法は、発芽大豆由来のアミンオキシダーゼを用いており、この発芽大豆のアミンオキシダーゼはスペルミンを基質とするとき1モルのスペルミンより2モルの過酸化水素を生成するが他のポリアミン即ちスペルミジン、ブトレツシン及びカダベリンからは1モルの過酸化水素を生成するので試料中の総ポリアミン量を求める場合、酵素反応の結果生ずる過酸化水素の総量を比色定量するのであるが、これらいずれの方法ともスペルミンに関して真の値より高い値が得られることとなりその結果これらの方は正確性に欠けることとなってしまう。特にスペルミン含量の多い血液を試料として臨床検査に用いる場合にはこれら酵素法による総ポリアミン測定法は誤差が大きくなつて使用不可能であった。

又、発芽大豆由来のアミンオキシダーゼは植物性の酵素であり、微生物由来の酵素に比して大量生産出来にくく、そのため臨床検査において大量に使用する場合、コスト的にも問題を有していた。

一方特開昭58-141798号方法はポリアミン溶液にミクロコッカス・フラビダスのブトレツシンオキシダーゼを用いるポリアミンの分析法であるが、このブトレツシンオキシダーゼは主としてブトレツシン、カダベリン、スペルミジンに作用する酵素であり、総ポリアミンのうちスペルミンには作用せず血液を試料として用いられないという欠点があり、更に特開昭58-146297号方法はペニシリウム属の產生するポリアミンオキシダーゼMを用いて試料中のスペルミン、スペルミジン、アセチルスペルミン及びアセチルスペルミジンからなる総ポリアミンの定量法であるが、このポリアミンオキシダーゼMはブトレツシン及びカダベリンには作用しないこと及びスペルミンに作用して1モルのスペルミンから2モルの過酸化水素を生成すること等のためこの方法もやはり正確な総ポリアミン量の測定方法とはなり得ないものであった。

そこで本発明者らは、これら事情に鑑み、従来の総ポリアミン量測定法に比較して迅速にしてより正確で精度のよい酵素法による総ポリアミン量

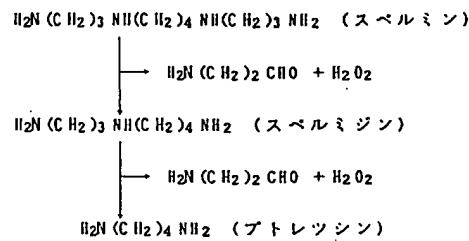
の測定法を開発すべく鋭意検討を重ねた。その結果、各種ポリアミンを含有する試料中のスペルミンをまずポリアミンオキシダーゼによってスペルミジンおよび/又はブトレツシンに変換せしめ、かつその際生成する過酸化水素を消去した後、次いでスペルミジン、ブトレツシン、カダベリンに作用し、かつスペルミジンからブトレツシンを生成しないアミン酸化酵素を添加し、反応させ、その際生成する過酸化水素を発色させ、比色定量することによって総ポリアミン量を求めればこの方法においては試料中のスペルミンと等モル量の過酸化水素が生成される結果、迅速にして正確な総ポリアミン量の測定が可能となることを知り、本発明を完成したものである。

本発明方法の特徴の1つは試料中の総ポリアミン量を酵素を用いて測定するに当り、前処理反応を施すことにある。

すなわち前処理反応として、あらかじめ総ポリアミンを含有する試料にポリアミン酸化酵素を作用させ、試料中のスペルミンを式1に従って等モ

ルのスペルミジンおよび／又はブトレツシンに変換してしまう。

式1



上記の前処理時に得られる反応生成物は必ずしも一定のものが得られるのではなく、温度・pH等の条件により異なった状態のものが得られる。すなわちスペルミンがスペルミジンを経てブトレツシンまで完全に分解される場合、スペルミンがスペルミジンに分解されそこで止まってしまう場合及びスペルミンからスペルミジンを経てスペルミジンの一部がブトレツシンに分解される場合（この場合はスペルミジンとブトレツシンの混合物が

得られる）等である。本発明においてはこれらいずれの場合においても次なる第2の反応に使用され得るが、公知のブトレツシン酸化酵素を用いる場合には反応性を考慮するとスペルミンが完全にブトレツシンに変換される場合がより好ましい。

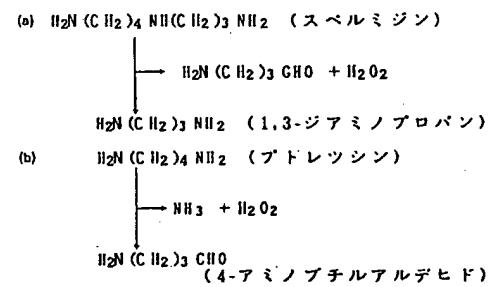
次いで、上記の前処理反応の結果、生成した過酸化水素を消去してしまうことも本発明法の2番目の特徴である。この理由は前処理段階で生成した過酸化水素が残存すると次なる反応に影響を与える測定誤差の要因となるので、この段階で生成される過酸化水素は完全に除去されねばならない。そのための方法として、カクテーゼを添加し過酸化水素を分解してしまう方法、或いはペルオキシダーゼの存在下、過酸化水素と反応する色原体の一つと反応させる方法等の一般的な過酸化水素除去方法が利用され得る。

こうした前処理反応によってスペルミンは等モルのスペルミジンおよび／又はブトレツシンに変換させられてしまう。その後に、総ポリアミンの定量法を行うのである。すなわちスペルミジン、

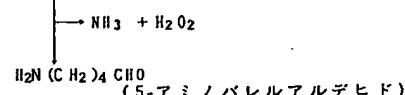
ブトレツシン及びカダベリンからなるポリアミン混合試料にスペルミジン、ブトレツシン及びカダベリンを分解する能力を有し、かつスペルミジンからブトレツシンを生成しないアミン酸化酵素を作用させることによってスペルミジン、ブトレツシン及びカダベリンよりそれぞれ等モルの過酸化水素が生成する。そこで、該過酸化水素を発色させ比色定量することによって総ポリアミン量を求めるものである。

以下にこれらの第2の反応に用いるアミン酸化酵素の反応式の1例を式II(a)～(c)にて示す。

式II



(c)  $\text{H}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_2)_5\text{NH}_2 \quad (\text{カダベリン})$



上記の反応式II(a)、(b)、(c)において用いられるアミン酸化酵素はスペルミジン、ブトレツシン、カダベリンに作用して等モルの過酸化水素を生成するものであればいずれにても用いられ得る。

次に参考例、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、ポリアミン酸化酵素と第2の反応に用いるアミン酸化酵素活性、ペルオキシダーゼ活性及びカクテーゼ活性測定法について述べる。なおポリアミン酸化酵素及びアミン酸化酵素の活性単位の表示は以下のように測定して、1分間に1  $\mu\text{mol}$  の過酸化水素を生成するに要する酵素量をもって1単位として定めたものである。

#### (1) ポリアミン酸化酵素

0.1M リン酸緩衝液 (pH6.5) 100mLに4-Aミノアンチビリン10mg、エノール 0.2mL、

ペルオキシダーゼ（ベーリング社製、グレードII）5mgを溶解し、発色液を調製する。

この発色液1.35mLと10mMスベルミジン0.5mLとの混合物を35℃で3分間予熱したのち、酵素液0.5mLを添加し反応させる。そして505nmにおける発色の分子吸光係数として6250を用い、生成する過酸化水素に起因する505nmの吸光度変化量（反応開始1分間の△A）より酵素活性を求める。

#### (2) 第2の反応に用いるアミン酸化酵素

代表的な1例としてブトレツシン酸化酵素の活性測定を示すと次のようである。

基質として10mMブトレツシン0.5mL及び発色液の緩衝液としてpH 8.5のリン酸緩衝液を用いる以外は(i)と全く同様にして酵素活性を求めた。

(3) ペルオキシダーゼ活性はビロガロール、過酸化水素を基質とし、pH 6.0、20℃反応において20秒間に1mgのブルプロガリンを生成する酵素量を1単位とした。

(4) カタラーゼ活性は過酸化水素を基質とし、pH

7.0、25℃反応において1分間に1μmolの過酸化水素を分解するに要する酵素量を1単位とした。

#### 参考例1

4-アミノアンチピリン7.5mg、ペルオキシダーゼ350単位を0.2Mリン酸緩衝液pH 7.1の100mLに溶解し、発色液Iとした。

(A) 発色液I 1.35mLにスペルミン溶液100nmol(1.60mL)を添加し、30℃、3分間予熱後、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルフォプロピル)-m-トルイジンナトリウム塩（以下TOSと略す）0.45mgとポリアミン酸化酵素AT-1（特開昭56-92788号公報記載）0.15単位(50μL)を添加した。30℃で10分間反応後、555nmの吸光度を測定した。（吸光度A）

(B) 発色液I 1.35mLにスペルミン溶液100nmol(1.50mL)を添加し、30℃、3分間予熱後、TOS 0.45mgを含むポリアミン酸化酵素AT-1 0.15単位(50μL)を添加した。30℃で10分間反応後、0.65M NaOH溶液(0.1mL)を添加し、(この

pHにおいてはポリアミン酸化酵素は作用せず、ブトレツシン酸化酵素は作用しやすくなる。）、次いでブトレツシン酸化酵素（アグリカルチュアル・バイオロジカル・ケミストリー（Agric.Biol.Chem.）第30巻、第1202頁（1966）に準じて調製した。）4.5単位(10μL)を添加し30℃、10分間反応後555nmの吸光度を測定した。（吸光度B）

(C) 発色液I 1.35mLにスペルミン溶液100nmol(1.20mL)とカタラーゼ20単位(0.2mL)を添加し、30℃で3分間予熱後、ポリアミン酸化酵素AT-1 0.15単位(10μL、TOSは含まない)を添加した。30℃で10分間反応後、0.65M NaOH溶液0.1mLと30mMアジ化ナトリウム0.1mLを添加し、更にTOSを含むブトレツシン酸化酵素4.5単位(50μL)を添加した。30℃、10分間反応後555nmの吸光度を測定した。（吸光度C）

上記の反応における吸光度は次の通りであった。  
吸光度A = 1.109

(200 nmolの過酸化水素量にはほぼ相当する)  
吸光度B = 1.664

(300 nmolの過酸化水素量にはほぼ相当する)

吸光度C = 0.552

(100 nmolの過酸化水素量にはほぼ相当する)

反応Cにおいてポリアミン酸化酵素との反応液にTOS(0.45mg含有)溶液を添加した場合の吸光度は0.000であった。

すなわち、吸光度Aは反応Aでスペルミンが完全にブトレツシンに酸化され2モル量の過酸化水素が生成されたことを示す。吸光度Bは反応Bでスペルミンとポリアミン酸化酵素との反応によって2モル量の過酸化水素と1モル量のブトレツシンが生成し、次いでブトレツシンがブトレツシンオキシダーゼによって完全に酸化され、計3モルの過酸化水素が生成されたことを示す。吸光度Cは反応Cでポリアミン酸化酵素との反応によって1モル量のブトレツシンとともに生成した2モル量の過酸化水素を同時に添加されたカタラーゼによって完全に分解してしまい（この処理のうちアジ化ナトリウムの添加によりカタラーゼの活性を失活させる必要がある。）、次いで生成したブト

レツシンをブトレツシン酸化酵素で分解することにより1モルの過酸化水素量が生成されたことを示している。すなわち反応Cの方法では、スペルミンと等モルの過酸化水素が生成されることとなりこの過酸化水素のモル数がすなわち、試料中のスペルミンのモル数となっている。

## 参考例2

スペルミン 100 nmol の代わりにスペルミジン 100 nmol を用いて参考例1と同様の検討を行った結果は次の通りであった。

吸光度 A = 0.554

(100 nmolの過酸化水素量に相当)

吸光度 B = 1.112

(200 nmolの過酸化水素量に相当)

吸光度 C = 0.556

(100 nmolの過酸化水素量に相当)

尚、反応Cのポリアミン酸化酵素との反応液に T.O.O.S (0.45mg 含有) 溶液を添加した場合の吸光度は 0.000 であった。

すなわち、吸光度 A は反応 A でスペルミジンが

ポリアミン酸化酵素で完全に 1 モル量のブトレツシンに酸化され 1 モル量の過酸化水素が生成することを示し、吸光度 B は反応 B でスペルミジンがポリアミン酸化酵素によって酸化され 1 モル量の過酸化水素と 1 モル量のブトレツシンが生成し、該ブトレツシンから更に 1 モル量の過酸化水素の計 2 モルの過酸化水素が生成したことを示す。更に、吸光度 C は反応 C でスペルミジンがポリアミン酸化酵素との反応によって 1 モル量のブトレツシンとともに生成された 1 モル量の過酸化水素がカタラーゼで完全に分解され（この後カタラーゼはアジ化ナトリウムの添加により完全に失活される。）、次いで該生成ブトレツシンにブトレツシンオキシダーゼを反応させることによって 1 モル量の過酸化水素量のみが測定されたことを示す。すなわち、反応 C の方法をとることによってスペルミジンより等モルの過酸化水素が生成し、従って過酸化水素を定量すれば即、それが試料中のスペルミジン量となっていることがわかる。

## 参考例3

スペルミン 100 nmol 代わりにブトレツシン 100 nmol 又はカダベリン 100 nmol を用いて参考例1と同様の検討を行った結果は次の通りであった。

	ブトレツシン	カダベリン
吸光度 A	0.000	0.000
吸光度 B	0.554	0.555
吸光度 C	0.553	0.554

すなわちポリアミン酸化酵素はブトレツシン、カダベリンを全く酸化せず、ブトレツシン酸化酵素によって分解され、等モル量の過酸化水素が生成することが示された。

## 参考例4

発色液 I 1.35mM と基質（スペルミン又はスペルミジン又はブトレツシン又はカダベリン）の各基質 100 nmol (1.50mM) のそれぞれに発色液 I 及び 0.65M NaOH 溶液 (0.1mL) を添加し、30°C、3 分間予熱後それぞれに T.O.O.S 0.45mg を含むブトレツシン酸化酵素 4.5 単位 (50μL) を添加した。30°C で 10 分間反応後 555nm の吸光度を測定した結果

は次の通りであった。

基質の種類	吸光度
スペルミン	0.000
スペルミジン	0.555
ブトレツシン	0.553
カダベリン	0.556

すなわち、ブトレツシン酸化酵素はスペルミンを全く基質としないがスペルミジン、ブトレツシン、カダベリンを酸化し、それぞれ等モル量の過酸化水素を生成することが示された。

## 参考例5

スペルミン又はスペルミジンの 10~100 nmol を基質として用いて参考例1と同様の操作を行った結果は表-1 に示される。

(以下余白)

表 - 1

スペルミジン 基質量 (nmol)	スペルミジン		
	吸光度A	吸光度B	吸光度C
1.0	0.111	0.167	0.057
2.0	0.223	0.333	0.113
4.0	0.444	0.664	0.222
6.0	0.669	1.002	0.355
8.0	0.887	1.335	0.442
10.0	1.114	1.666	0.557

すなわち、反応 C はスペルミン、スペルミジン各々 10~100 nmol の範囲でスペルミン、スペルミジン量に相当する量の過酸化水素を測定でき、非常に正確な総ポリアミン量が測定できることが示された。

## 参考例 6

10 mM スペルミン、10 mM スペルミジン、10 mM プトレツシン、10 mM カダベリンの各単独の試料、これら 4 種のポリアミンを各々 1 : 1 : 1 : 1 の比で混合した試料（混合試料 A）と 2 : 2 : 1 : 1 の比で混合した試料（混合試料 B）の 6 種類を基質として調製した。各基質（10 μl）の各々に発色液 1.35 ml と蒸留水 1.20 ml、カクランゼ 20 単位（0.2 ml）を添加し、30°C で 3 分間予熱後ポリアミン酸化酵素 0.15 単位（10 μl）を添加した。30°C、10 分間反応後 0.65 M NaOH 溶液 0.1 ml と 30 mM アジ化ナトリウム 0.1 ml を添加し、更に T O O S 0.45 mg を含むプトレツシン酸化酵素 4.5 単位（30 μl）を添加した。30°C で 10 分間反応後 555 nm の吸光度を測定した結果は次の通りであった。

基質の種類	吸光度
スペルミン	0.555
スペルミジン	0.553
ブトレツシン	0.554
カダベリン	0.554
混合試料 A	0.557
混合試料 B	0.555

すなわち、各ポリアミンの単独液或いはいかなる混合液においても本方法が使用できることが示された。

## 参考例 7

発色液 A-d を下記の様に調製し、A ~ D のそれぞれ 1.35 ml と基質（1.0 mM スペルミジン又は 1.0 mM スペルミン）0.10 ml、30 mM アジ化ナトリウム溶液 0.10 ml、蒸留水 1.25 ml を混合し、30°C で 3 分間予熱した。この液にポリアミン酸化酵素 AT-1 0.15 単位（50 μl）を添加し、30°C で 10 分間反応した。反応終了後、発色液 A ~ D を用いた反応に対し、それぞれ発色液 a ~ d 0.01 ml と 0.65 M 水酸化ナトリウム溶液 0.10 ml を添加し、555 nm の吸光度

を測定した（吸光度 A）。次いでこの反応液にブトレツシン酸化酵素 4.5 単位（50 μl）を添加し、30°C で 10 分間反応を続け 555 nm の吸光度を測定した（吸光度 B）。その結果は表 - 2 に示される。

表 - 2

発色液	スペルミジン		スペルミン	
	吸光度 A	吸光度 B	吸光度 A	吸光度 B
A - a	0.553	1.108	1.110	1.663
B - b	0.000	0.554	0.000	0.556
C - c	0.556	1.113	1.108	1.664
D - d	0.000	0.555	0.000	0.553

## 〔発色液の調製〕

発色液 A : 4 AA 7.5 mg を 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) の 100 ml に溶解

発色液 B : 4 AA 7.5 mg とペルオキシダーゼ 350 単位を 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) の 100 ml に溶解

発色液 C : T O O S 33.7mg を 0.2M リン酸緩衝液 (pH7.1) の 100mL に溶解

発色液 D : T O O S 33.7mg とペルオキシダーゼ 350 単位を 0.2M リン酸緩衝液 (pH7.1) の 100mL に溶解

発色液 a : T O O S 44.5mg とペルオキシダーゼ 350 単位を 10mM リン酸緩衝液 (pH7.0) の 1.0mL に溶解

発色液 b : T O O S 44.5mg を 10mM リン酸緩衝液 (pH7.0) の 1.0mL に溶解

発色液 c : 4 A A 10.0mg とペルオキシダーゼ 350 単位を 10mM リン酸緩衝液 (pH7.0) の 1.0mL に溶解

発色液 d : 4 A A 10.0mg を 10mM リン酸緩衝液 (pH7.0) の 1.0mL に溶解

表 - 2 より明らかのように B と b すなわち B - b 及び D と d すなわち D - d の組み合せで反応液中のスペルミン及びスペルミジン量が正確に測定できることがわかった。

すなわち、スペルミジン、スペルミンをポリア

ミン酸化酵素で酸化した時に生成する過酸化水素をペルオキシダーゼの存在下で過酸化水素の測定に用いられる色原体の一方のみと反応することによって消去し、ひきつづき色原体の混合系においてブトレツシン酸化酵素を作用させることによって総ポリアミン量が正確に測定できた。

#### 参考例 8

T O O S 33.7mg、ペルオキシダーゼ 350 単位を 0.2M リン酸緩衝液 (pH7.1) の 100mL に溶解し、発色液 II を調製した。この発色液 1.35mL にスペルミン 10~100 nmol、スペルミジン 10~100 nmol、ブトレツシン 10~100 nmol、カグベリン 10~100 nmol、並びに参考例 6 と同様に調製した試料 A (10mL)、試料 B (10mL) の各試料に蒸留水を添加 (液量: 2.70mL) し、30°C、3 分間予熱した。次にポリアミン酸化酵素 A T - 1 0.15 単位 (50mL) を添加し、30°C で 10 分間反応した。この反応液に 4-アミノアンチビリン溶液 (1.0mg/mL) 0.1 mL と 0.65M 水酸化ナトリウム溶液 0.1mL を添加し 555nm の吸光度を測定した (吸光度 A)。

更に統いてこの反応液にブトレツシン酸化酵素 4.5 単位 (50mL) を添加し、30°C で 10 分間反応を続けた後 555nm の吸光度を測定した。その結果は表 - 3 及び表 - 4 に示される。

(以下余白)

表 - 3

基質 (nmol)	アトレツシン		カグベリン		スペルミジン		スペルミン	
	吸光度 A	吸光度 B	吸光度 A	吸光度 B	吸光度 A	吸光度 B	吸光度 A	吸光度 B
1.0	0.000	0.056	0.000	0.055	0.000	0.053	0.000	0.057
2.0	0.000	0.109	0.000	0.108	0.000	0.108	0.000	0.112
4.0	0.000	0.223	0.000	0.221	0.000	0.222	0.000	0.220
6.0	0.000	0.335	0.000	0.333	0.000	0.336	0.000	0.334
8.0	0.000	0.443	0.000	0.445	0.000	0.444	0.000	0.442
10.0	0.000	0.555	0.000	0.554	0.000	0.556	0.000	0.555

表 - 4

試 料 A (ブトレツシン:カグベリン :スペルミジン:スペルミン = 1:1:1:1)		試 料 B (ブトレツシン:カグベリン :スペルミジン:スペルミン = 2:2:1:1)	
吸光度A	吸光度B	吸光度A	吸光度B
0.000	0.557	0.000	0.554

すなわち、ポリアミン酸化酵素AT-1がスペルミン又はスペルミジンを酸化した時に生成された過酸化水素はいずれもT O O S-ペルオキシダーゼの存在下による反応で除去され、吸光度Bで得られた値は各々の基質の濃度を反映するものであった。従って試料A、試料Bにおいてもその総量が測定され、一段目の反応（ポリアミン酸化酵素との反応）によって生ずる過酸化水素を除去し、ブトレツシン酸化酵素を作用させることにより容易に総ポリアミン量を測定できることが示された。

こうして参考例1～8によって明らかのように、各種ポリアミンを含む試料をまずポリアミン酸化

酵素によって処理し、その際生成する過酸化水素をカタラーゼ又はペルオキシダーゼ及び過酸化水素と反応する色原体を添加することによって消去し、かかるのちスペルミジン、ブトレツシン及びカグベリンに作用し、かつスペルミジンからブトレツシンを生成しないアミン酸化酵素を作用させれば試料中の総ポリアミン量が正確に容易に測定できることがわかったのである。

#### 実施例 1

スペルミン、スペルミジン、ブトレツシン、カグベリンの各10mM溶液を2:2:1:1の比率で混合して調製した溶液の25μl又は50μlを血液5.0mlに添加し、3分間激しく攪拌後、3,000rpmで5分間遠心分離し上澄液を集めた（6.2ml）。この上澄液を中和し（pH6～7付近）アンバーライトCG-50カラム（0.5×1cm）に吸着させた。カラムを蒸留水で水洗（3.0ml）後、0.5M塩酸（3.0ml）でポリアミン類を溶出し、0.67M水酸化ナトリウム溶液（2.0ml）を添加し中和した。この中和液を以下の反応の試料として使用した。

発色液1.35mlに上記中和液1.50mlとカタラーゼ50単位（25μl）を添加し、30℃で3分間予熱後ポリアミン酸化酵素AT-1 0.15単位（25μl）を添加し、更に10分間加温した。次に1.35M水酸化ナトリウム溶液（50μl）と60mMアジ化ナトリウム、0.45mg T O O Sを含むブトレツシン酸化酵素4.5単位（50μl）を添加し、更に30℃で10分間反応した。反応液の555nmの吸光度は次のとおりであった。

無添加	0.053
25μl添加	0.312
50μl添加	0.575

この値より添加回収率を計算すると、25μl添加の場合 100.4%、50μl添加の場合 101.1%と非常に良好であった。

#### 実施例 2

尿20mlに12N塩酸5mlを添加し、100℃、3時間加水分解し、結合型ポリアミンを遊離型ポリアミンとした。（なお加水分解中に生じた沈殿は遠心分離（5,000rpm、5分）で除去し、次いで上澄

液分は10N水酸化ナトリウム溶液でpH6付近に調整後蒸留水を添加し60mlとした。）この中和液をアンバーライトCG-50カラム（1×2.5cm）に吸着させ、カラムは蒸留水20ml、0.5N塩酸溶液3mlで洗浄した。次にこのカラムより0.5N塩酸10mlでポリアミンを溶出し、10N水酸化ナトリウム溶液でpH7.5付近に調整し、蒸留水で20mlとした。この中和液を試料として実施例1の反応と同一の操作を行った結果、その555nmの吸光度は0.445であった。この値は反応液中に80.1 nmolのポリアミンが存在したことを示す。すなわち尿1ml中に53.4 nmolのポリアミンを含むことを示した。又、中和液を5倍濃縮し、その100μlを用いてアミノ酸分析計にてポリアミンの測定を行った結果（測定法は〔アグリカルチヤル・バイオロジカル・ケミストリー（Agric.Biol.Chem.）第44巻、2467頁～2475頁（1980）〕に従って行った。）尿中1ml中に52.7 nmolのポリアミンを含むことが示され、本方法が化学的分析法と非常によく相關することが示された。